

ヒト幹細胞由来心筋細胞 (hSC-CM) の培養

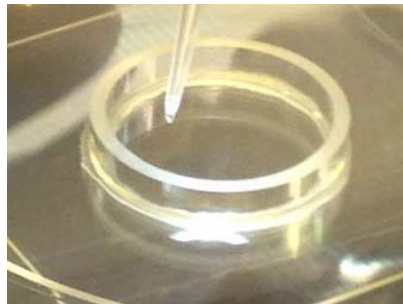
1. MED プローブの前処理

電極上で hSC-CM を培養する上で最重要のステップが MED プローブ表面の前処理です。MED プローブの表面はやや疎水性を帯びているため、組織が密着しやすいように親水性を高めるコート処理が必要となります。たとえそれ以外の事前準備が完全であっても、大規模な凝集や、早期の細胞死が起こる可能性があります。その場合、MED プローブのコート処理に問題があることが多いようです。マトリゲルは、hSC-CM の培養に関してはその効果と信頼性が高いコート剤です。マトリゲルによるコート処理は以下の通りです。

1. MED プローブを 70%エタノールに 15 分間浸し、クリーンベンチ内で乾燥させます。
2. MED プローブを 100 mm ディッシュに入れ、周囲にキムワイプを敷きます。キムワイプを 1-2 ml の (適量の) 滅菌水 (SDW) で湿らせます (**注: MED プローブは、以降の手順においても、湿らせたキムワイプを敷いた 100 mm ディッシュ内で管理します。**)。

[マトリゲルコートの場合]

3. 2 μ l のマトリゲル (BD Biosciences #354277) 溶液を MED プローブの記録電極部分にのみ滴下します。マトリゲル溶液はメーカーの取扱説明書に従って調製し、-20°C で分注保存して使用直前に溶解します。



4. マトリゲル溶液を滴下した MED プローブを少なくとも 30 分間インキュベーター内に放置します。マトリゲル溶液が蒸発しない限り、長時間放置してもかまいません。

[ファイブロネクチンコートの場合]

3. 2 μ l の 50 μ g/ml ファイブロネクチン溶液を MED プローブの電極部分にのみ滴下し、1 時間インキュベーター内に放置します。

2. 培養用ディッシュからの hSC-CM の回収

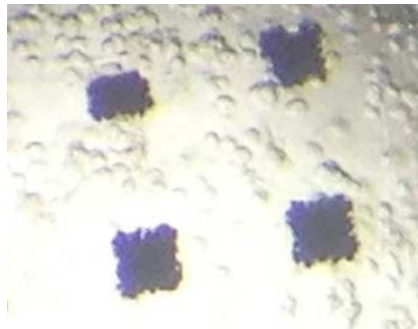
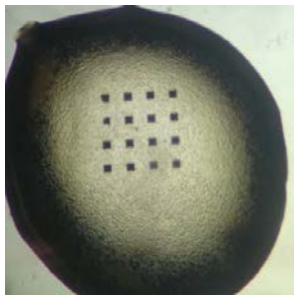
本プロトコルは 6 ウェルディッシュの 1 ウェルにつき約 2×10^6 の心筋細胞を分化させる二次元単層培養法に基づいています。

1. 維持用培地を抜き取ります。
2. 心筋細胞を 1 ml の D-PBS で濯ぎます。
3. 1 ml のトリプル溶液を注ぎ、およそ 10 分間インキュベーター内に放置します。3 分間程度おきに剥離状態を確認しながら、放置する時間を最適化します。心筋細胞層が個々の単一細胞に分離し始めたら、ディッシュの側面をやさしくタッピングして、心筋細胞層を浮遊させます。
4. 1 ml のピペッターを使って、ディッシュ表面を 3-5 回トリプル溶液で濯ぎ、心筋細胞を完全に剥離させます。
5. 血清を含む維持用培地を 2 ml 注ぎ、トリプシン反応を停止させます。
6. トリプル溶液と維持用培地が混合した細胞懸濁液を 15 ml の遠沈管に移します。
7. さらに 2 ml の維持用培地で各ウェルを 3 回濯ぎ、15 ml の遠沈管に移します。
8. 室温下で $180 \times g$ により 5 分間遠心分離します。
9. 心筋細胞ペレットが乱れないように注意しながら上清を抜き取ります。0.5 μ l の維持用培地を加えてやさしくピペティングし、再懸濁させます。
10. 細胞数をカウントして、最終生存細胞数が $1 \times 10^4/\mu$ l (7.5×10^3 - $1.5 \times 10^4/\mu$ l) となるようにします。
11. 必要に応じて手順 8-10 を再度行い、最終生存細胞数が $1 \times 10^4/\mu$ l となるようにします。

3. hSC-CM の播種

[単層培養の場合]

1. マトリゲルコートした MED プローブをインキュベーターから取り出し、電極上からマトリゲル溶液を除去します。
2. 2 μ l の細胞懸濁液（細胞数およそ 2×10^4 ）を記録電極部分にのみ滴下します。
3. 細胞懸濁液を播種した MED プローブを 37°C のインキュベーター内に 3-4 時間放置します。
4. 顕微鏡下で 200 μ l のピペッターを使って、生着した心筋細胞が剥離しないように注意しながら、血清を含む維持用培地 1 ml をやさしく注ぎます。
 （注：播種時の血清濃度は少なくとも 20%（～50%）にし、心筋細胞が電極に生着しやすくなるよう促します。培地はピペッターを使って MED プローブのリング内縁から円を描くように加えていき、細胞懸濁液に届く手前で止めます。最後にゆっくりと培地を加えて、細胞懸濁液に到達させます。心筋細胞が剥離しなければ、さらに培地を加えて全容量を 1 ml にします。）
5. 一晚培養後、さらに 1 ml の培地を加えます。培地は毎日半量交換します。心筋細胞がしっかり生着した後は、無血清培地を使うこともできます。



[hSC-CM 胚様体の場合]

1. MED プローブにおよそ 1 ml のマトリゲル溶液を注ぎ、滅菌済 100 mm ディッシュで管理します。
2. マトリゲル溶液を滴下した MED プローブを少なくとも 30 分間インキュベーター内に放置します。マトリゲル溶液が蒸発しない限り、長時間放置してもかまいません。
3. MED プローブをインキュベーターから取り出し、余分なマトリゲル溶液を抜き取って、およそ 1 ml の維持用培地を注ぎます（注：播種時の血清濃度は少なくとも 20%（～50%）にし、心筋細胞が電極に生着しやすくなるよう促します。）。
4. 電極を囲うように外径 10 mm x 高さ 10 mm のクローニングシリンダー（Corning #3166-10）をチャンバーリング中央に立てます。
5. 10 μ l のピペッターを使って胚様体を回収し（ピペットの先端は胚様体を吸い取ることができる口径にカットします）、クローニングシリンダー内に移します（注：複数の胚様体を播種することもできますが、時間が経つと電氣的に同期してしまう可能性があります。）。
6. 胚様体を電極上へとやさしく転がします。
7. 一晚培養後、さらに 1 ml の培地を加えます。培地は毎日半量交換します。心筋細胞がしっかり生着した後は、無血清培地を使うこともできます。

4. MED64 システム専用ソフトウェアによる活動の記録

hSC-CM は 2、3 日以内に自発拍動を始めますが、自発拍動は播種後 3-7 日してからより安定的で、周期的になります。自発拍動は未成熟であることを意味しますが、拍動数に対する薬理作用を調べることができます。

[事前準備]

hSC-CM から活動を記録する場合、通常 95%O₂-5%CO₂、35.8-36.5°C 環境下にすることが求められます。拍動数は温度感受性が非常に高く、37.0°C をかすかに超える温度でも拍動数が非常に速くなります。そのため、環境温度を上記範囲内で安定的に維持することが極めて重要となります。

1) CO₂ インキュベーターを使用する場合

MED コネクターを CO₂ インキュベーター内に設置します。実験に使用する投与薬物の入った容器はインキュベーター内に放置するか、恒温槽で加温することで薬物投与に伴う温度変化を最小限に抑えます。インキュベーターのドアの開閉は環境温度を低下させるため、拍動数を抑制する原因となります。環境温度が設定温度に戻ってから、データの記録をするようにします。また、CO₂ インキュベーターはノイズ源となります。特に CO₂ インキュベーターの電源を入れた後、温度が急速に上昇する際には、CO₂ インキュベーターの回路が作動することでノイズが誘起されます。CO₂ インキュベーターの電源は、データの記録を開始する数時間前に入れるようにします。

2) MED 温度制御付コネクタを使用する場合

MED 温度制御付コネクタは底面部から MED プローブのチャンバー内を加熱します。設定温度を安定的に保持するため、チャンバーには蓋をしながら CO₂ ガスを供給する必要があります。灌流キャップ (MED-KCAP02) には CO₂ ガスを供給するためのポートがあります。CO₂ ガスは三角フラスコに満たした DDW で加湿してから供給するように配管し、チャンバー内を湿度 100% 環境にします。



チャンバー内の温度を安定させるため、以下の点を考慮します。

1. 記録を始める少なくとも 1 時間前に、MED 温度制御付コネクタの電源を入れます。
2. 設定温度を変える場合、表示温度が新しい設定温度で安定するまで待ちます。30 分以上かかる場合があります。
3. 空調機の近く等、室温が変化しやすい場所での MED 温度制御付コネクタの使用を避けます。
4. 投与薬物は設定温度と同じ温度になるように、事前に加熱します。

[データの記録]

MED プローブは 64 つの記録電極と 4 つの参照電極がパターンニングされており、MED64 システムではその電極間に発生する電位差を計測します。計測されるアナログ信号は MED コネクタ及び MED 温度制御付コネクタを介して MED64 ヘッドアンプに入力され、MED64 ヘッドアンプで 10 倍に増幅されてから、MED64 メインアンプでさらに増幅され、デジタル化されます。MED64 ハンドブックおよび Mobius チュートリアルをよく読んで、MED64 システムを適切に設置、操作してください。

必要となる機器

MED プローブ …… 1 個	MED コネクタもしくは MED 温度制御付コネクタ …… 1 個
MED64 ヘッドアンプ …… 1 個	MED64 メインアンプ …… 1 個
計測用 PC システム …… 1 個	Mobius (Mobius QT パッケージもしくは Mobius QT & EP パッケージ) …… 1 ライセンス

1. 培養細胞を含む MED プローブを MED コネクタもしくは MED 温度制御付コネクタに設置します。

(注 1: MED コネクタとケーブルは、100%湿度の CO₂ インキュベーター内に放置できます。これは、MED コネクタが受動的回路のみで構成されるためです。従って、CO₂ インキュベーター内の無菌環境で、適切な温度、湿度条件により長期間の記録を行うことができます。)

(注 2: 記録中に MED コネクタを 100%湿度のインキュベーターに放置する際には、MED コネクタの接触ピンを清潔に保つよう十分な配慮をしてください。わずかな堆積物や塩類等の付着でさえも、低周波ノイズの原因になります。MED プローブを MED コネクタに設置する前に、そのターミナル部分をエタノールをしみ込ませたキムワイプで毎回拭ってください。)

2. Mobius のテンプレートワークフローを使って記録を開始します (詳しくは、Mobius チュートリアル p.83 「第 4 章 Mobius QT」をご参照ください。)。下記のテンプレートワークフローを利用すれば、すぐにデータの記録が行えます。

Beat_recording: 拍動数と拍動間隔の記録および解析

QT_recording: 自発活動の電場電位間隔 (Field Potential Duration: FPD) の記録および解析

Pacing_recording: 電気ペーシングに対する応答とその FPD の記録および解析

FPD 解析を行う場合、推奨するデータ記録条件は下記の通りです。

Input Range (最大許容入力): 2.9 mV

Low cut freq (ハイパスフィルター): 1 Hz

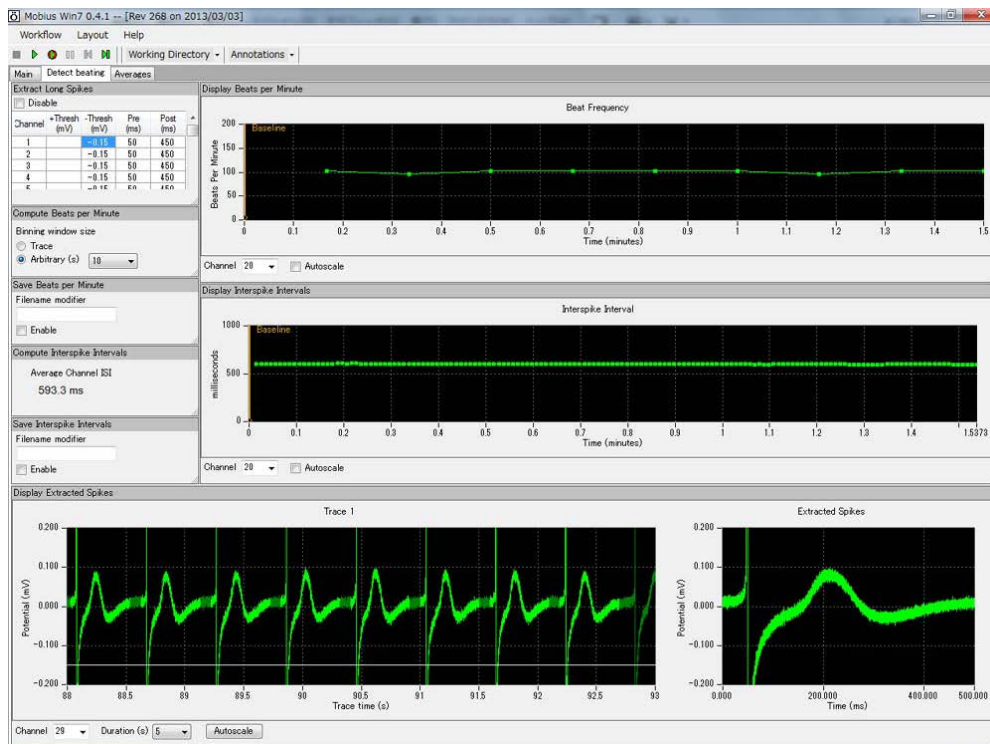
High cut freq (ローパスフィルター): 1000 Hz

データ記録条件は、記録される信号の大きさや実験目的に合わせて変更します。High cut freq を 10 kHz にする場合は、Input Range を 5 mV に変更します。MED64 システムは拍動する hSC-CM から簡単に電場電位を記録でき、Mobius QT にはさまざまな解析機能が搭載されています。Mobius の解析データは他社のソフトウェアでも解析できるように出力できます。

5. データの解析

[拍動数の解析]

Mobius QT の Beat_recording、Beat_frequency_analysis を利用すれば、データの記録中もしくは記録後に、拍動数と拍動間隔を出力することができます（詳しくは、Mobius チュートリアル p.83 「第 4 章 Mobius QT」をご参照ください）。

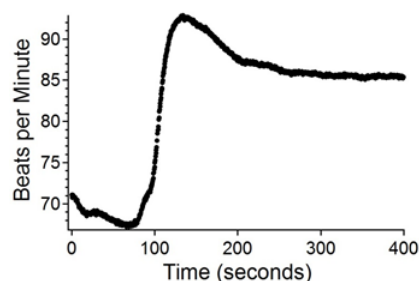


[拍動数（瞬時値）の解析]

上記のテンプレートワークフローを使って、拍動数と拍動間隔を ASCII 形式のデータとして出力できます。瞬時の拍動数は拍動間隔 (ms) を 1000 で割った値に 60 を掛けることで得られます。瞬時の拍動数は Excel や他社のソフトウェア上でグラフ化でき、拍動数に対する薬効の時間経過を示す図を作成できます。

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

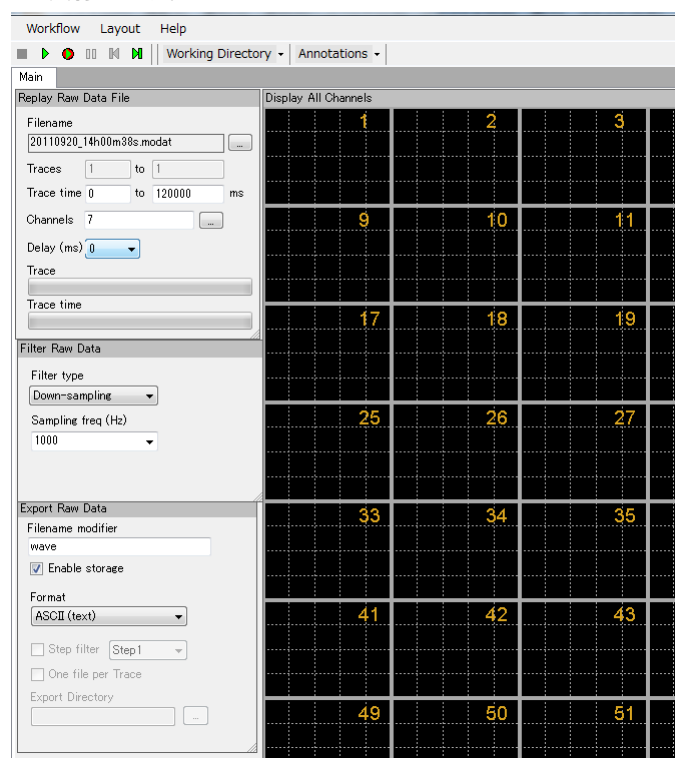
time_secs	phase	ch38	71.06479
6	0.9809	844.3	71.06479
7	1.8287	847.8	70.77141
8	2.6727	844	71.09005
9	3.517	844.3	71.06479
10	4.3618	844.8	71.02273
11	5.208	846.2	70.90522
12	6.0545	846.5	70.88009
13	6.9018	847.3	70.81317
14	7.7491	847.3	70.81317
15	8.5964	847.3	70.81317
16	9.4464	850	70.58824
17	10.2975	851.1	70.497
18	11.1503	852.8	
19	12.0029	852.6	
20	12.8557	852.8	
21	13.7071	851.4	
22	14.5622	855.1	
23	15.4183	856.1	
24	16.2751	856.8	



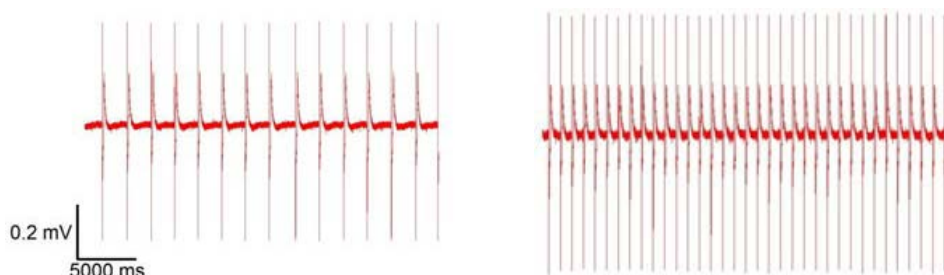
[薬物の変事作用の図示]

hSC-CM に対する薬物の変事作用を図示する場合、定常状態に至った自発拍動を図示するとわかりやすいです。Spike_train ワークフローを使って、以下の手順により作成します。

1. Spike_train ワークフローを <http://www.med64.com/resources/utilities.html> からダウンロードします。
2. Replay Raw Data パネル上で、出力する Trace #、Trace time、チャンネルを設定します。
3. Filter Raw Data パネル上で、Filter Type から Down-sampling を選び、1000 Hz に設定します。記録した信号に基づいて、最適なサンプリング周波数に変更します。
4. Export Raw Data パネル上で、出力するファイル名に付け足すテキスト文字を必要に応じて入力し、データ形式を選択して、Enable storage にチェックを入れます。
5. 録画ボタンでワークフローを実行します。

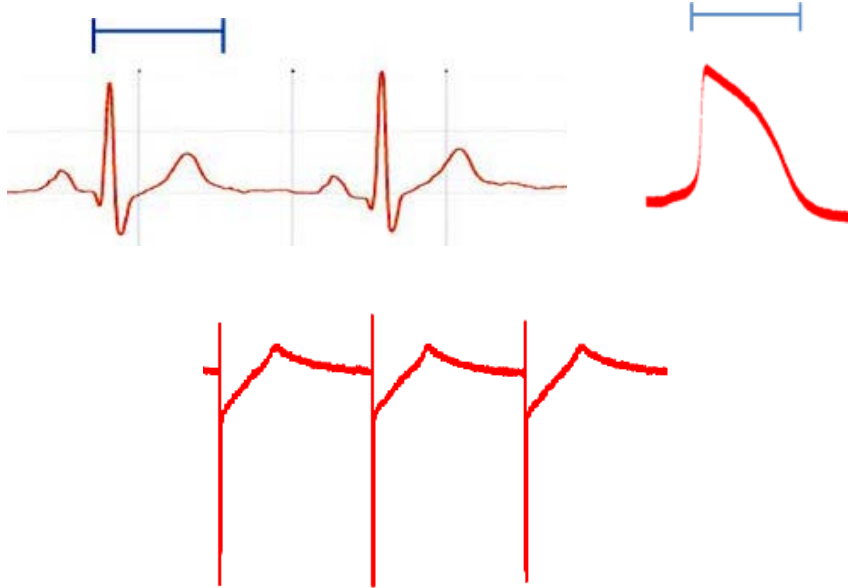


6. 出力された ASCII ファイルを Excel 等のグラフ作成ソフトで読み込み、下図のようにグラフ化します。

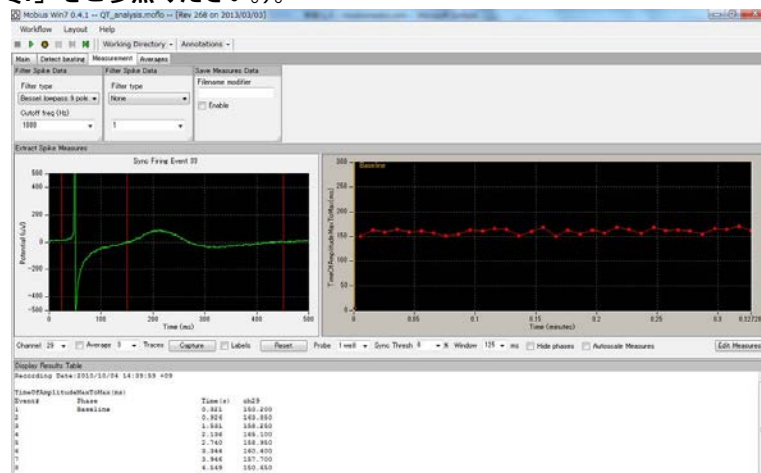


[FPD 解析]

hSC-CM の理想的な電場電位は、高周波の脱分極由来のスパイク（主に Na^+ の流入による）に続いて、低周波の電位波形（ K^+ の放出による）が伴います。おおまかに言って、FPD は心電図の QT 間隔に相当し、パッチクランプ法で記録される活動電位持続時間に相当します。FPD の解析は TdP の予測に有効です。



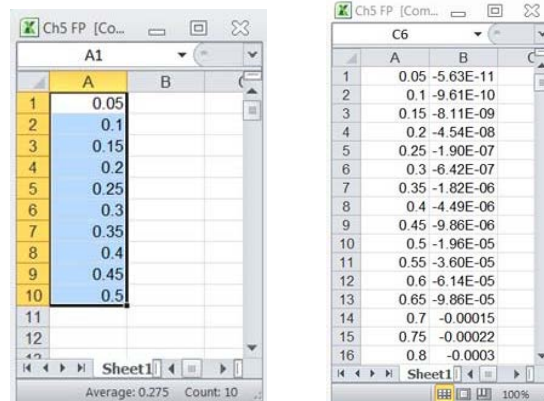
FPD 解析には QT_recording ワークフローもしくは QT_analysis ワークフローを利用できます。Mobius では電場電位持続時間に相当する時間をいくつかの算出測度の選択肢から選んで自動算出できます（詳しくは、Mobius チュートリアル p.83「第 4 章 Mobius QT」をご参照ください）。



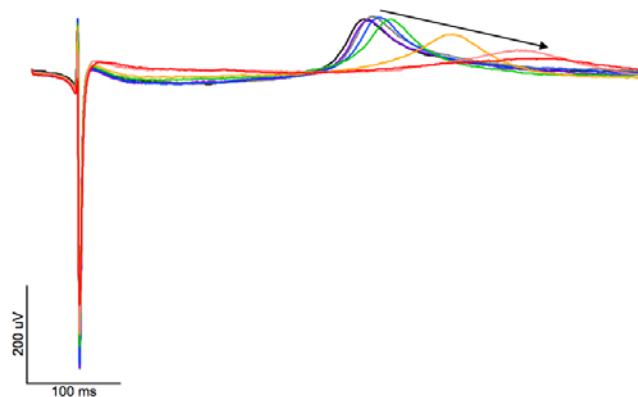
[電場電位波形データの出力]

Mobius では電場電位波形を ASCII 形式で出力できます。FPD 試験では薬効が定常状態に至るまで 10-15 分間の記録時間を必要とし、最後の 30 秒間を解析対象区間とするケースが多いようです。見栄えのよいグラフを作成する場合、最後の 30 秒間の波形を加算平均した波形で比較を行います。

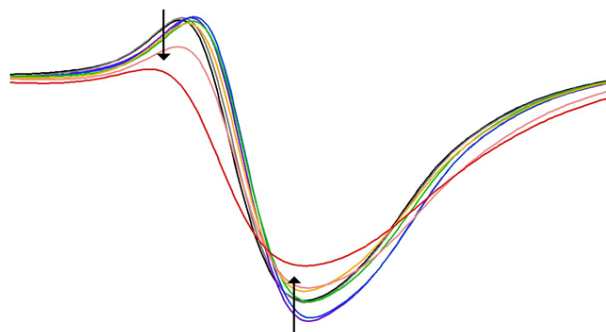
1. Extract Spike Measures パネルの Average にチェックを入れます。
2. Extract Spike Measures パネルの Trace に最後の 30 秒間のスパイク数を入れます。
3. Main タブの Replay Raw Data パネル上で最後の 30 秒間を再生できるように Trace time を設定します。
4. Mobius を再生ボタンで実行します。移動平均波形が Extract Spike Measures パネルのチャート上に表示されます。
5. チャート上で右クリックから Copy Data を選択します。
6. Excel のシートに 0.05 から 0.05 間隔ずつ列に数値を入れてきます。そして、波形の数値データを右隣の列に貼り付けます。



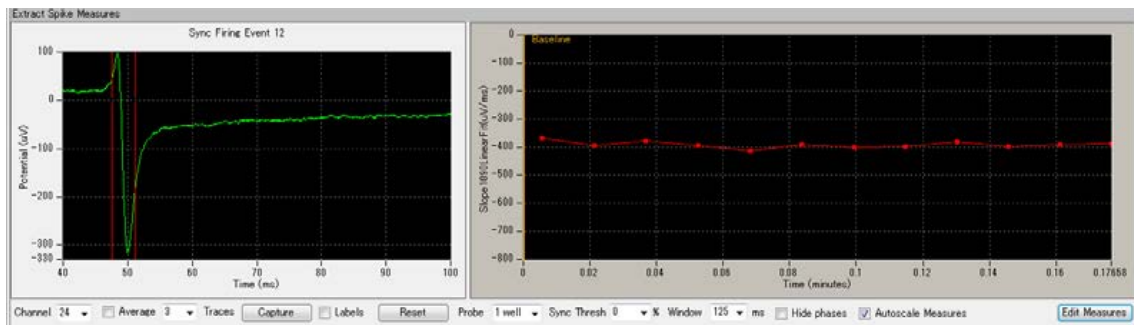
7. 時間を横軸、電位を縦軸とした電場電位波形のグラフチャートを折れ線グラフで作成し、FPD を算出します。各用量における平均波形を重ねることで、FPD 延長の用量依存性を示すグラフを作成します。

[Na⁺電流阻害の解析]

脱分極由来の高周波スパイクは主に Na⁺電流の流入に起因するため、振幅を解析することで心筋の Na⁺チャンネル阻害を検討できます。下図の波形の脱分極スパイクの拡大図は、Na⁺チャンネル阻害薬であるキニジンの作用を示します。



以上の解析は Mobius (ワークフローテンプレート QT_recording もしくは QT_analysis) を利用して、Extract Spike Measure パネルで振幅や傾きの測度を選択することでも算出できます (詳しくは、Mobius チュートリアル p.83 「第 4 章 Mobius QT」をご参照ください)。



6. ペーシングデータの記録と解析

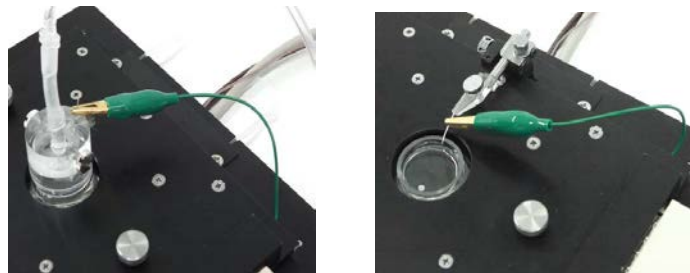
FPD は拍動間隔に依存して生理的に変化します。ペーシングしながら FPD を評価することで、拍動数を制御できます。

[ペーシングしながら記録する際の注意]

以下の手順に従って、刺激アーチファクトを抑えます。

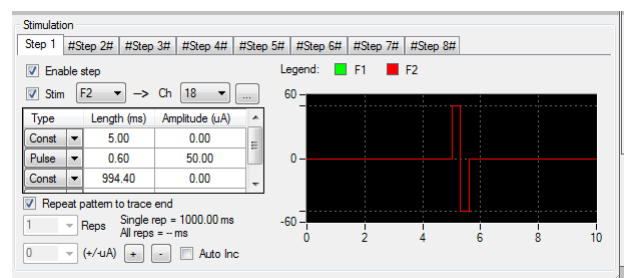
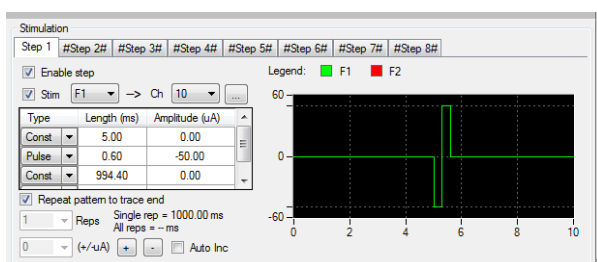
1. 白金線の使用

参照電極の面積を広げるため、白金線を MED プローブチャンバー内に設置します。MED コネクターの上部ユニットに付属のミノムシクリップで白金線をつまんでアースと導通させます。



2. 双極刺激の印加

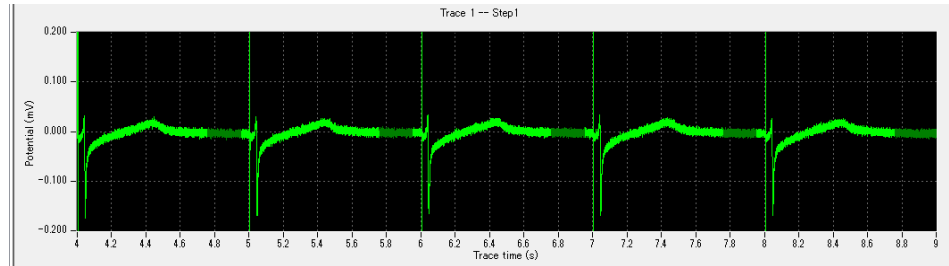
隣接する 2 つの電極を同時に刺激することで、より効果的にペーシングできます。刺激パルスの極性は互いに反転させます。ペーシング応答を記録する場合、テンプレートワークフローの Pacing_recording を利用できます。テンプレートを開き、F2 スティミュレーターにチェックを入れ、F1 のパルスを反転させた刺激波形を作成します。



また、ペーシング間隔は自発的拍動間隔よりも短くしなければなりません。以下の刺激条件でペーシングを行い、できなかった場合は刺激電流を増大させます (最大 200 μ A まで)。

刺激間隔: 0.4-0.6 ms

刺激電流強度: 50 μ A



7. MED プローブの洗浄方法

電極の低インピーダンス (<50 kΩ) を維持することが S/N 比の良い信号を記録する上で非常に重要となるため、MED プローブは使い捨て使用を想定して製造されています。また、低インピーダンスを維持することは、刺激を印加する際にも重要となります。

インピーダンスは MED プローブを繰り返し使用することで上昇します。これは MED プローブ自体の取り扱いや、(実験後に組織を取り除いた後) 組織からの有機物質の集積が原因で電極が損傷されるためです。組織をやさしく取り除き、丁寧に洗浄すれば MED プローブを繰り返し利用することができます (**注: MED プローブの表面には触れないでください。電極と絶縁層を損傷する可能性があります。**)。

[EDTA-コラゲナーゼ処理による洗浄]

1. 培養切片や培養細胞が存在した状態で MED プローブに 0.5 mM EDTA (Life Technologies #25300-054) を注ぎ、1 時間放置します。
2. PBS でチャンバー内を 3 回濯ぎます。
3. PBS で I 型コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich #C0130) を溶解し、20 U/ml にします。
4. コラゲナーゼ溶液をチャンバーに注ぎ、37°C のインキュベーター内で 1 時間放置します。
5. 使用済のコラゲナーゼ溶液を廃棄し、プローブを純水で少なくとも 3 回は濯ぎます。
6. 洗浄後の MED プローブは SDW を満たした状態で 90 mm ディッシュに入れ、冷蔵保管します。

(**注: MED コネクターとケーブルは、100%湿度の CO₂ インキュベーター内に放置できます。これは、MED コネクターが受動的回路のみで構成されるためです。従って、CO₂ インキュベーター内の無菌環境で、適切な温度、湿度条件により長期間の記録を行うことができます。**)

[漂白剤処理による洗浄]

1. 培養切片や培養細胞が存在した状態でチャンバー内を約 1 ml の漂白剤 (Clorox 等) で 3 回濯ぎます。
2. 漂白剤を MED プローブに注いだまま 15-30 秒間放置します (**注: この処理後も洗浄しきれない場合は、さらに 2 回濯いでから、MED プローブを長時間漂白剤に曝します。通常は 1-2 分間で十分ですが、15 分間までは可能です。20 分以上は曝さないでください。**)。
3. 漂白剤を廃棄し、プローブを DDW で少なくとも 5 回は濯ぎます。
4. MED プローブを乾燥させます。

7. 謝辞

本プロトコルは以下のユーザー様からの情報提供により作成しました。

Enrique G. Navarrete 先生 (スタンフォード大学 心臓血管研究所)

Ping Liang 先生 (スタンフォード大学 心臓血管研究所)

Feng Lan 先生 (スタンフォード大学 心臓血管研究所)

Michael Trujillo 先生 (オートメイトサイエンティフィック社)